

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Tanaman Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*)

Tanaman jeruk telah ditanam dan dikembangkan sejak lebih dari 4.000 tahun. Tanaman ini tumbuh hampir di setiap negara di dunia pada 40° garis lintang utara-selatan. Jeruk menyebar di dunia melalui berbagai eksplorasi dan peristiwa sejarah diantaranya the conquest dari Alexander Agung, penyebaran ajaran Islam, dan eksplorasi Colombus, yang telah membawa jeruk ke Dunia baru (Septirosya, 2014).

Tanaman jeruk merupakan komoditas buah-buahan yang termasuk kedalam jenis tanaman hortikultura yang sangat dibutuhkan oleh manusia untuk pemenuhan gizi yang seimbang sebagai sumber vitamin, mineral dan protein yang tidak dapat diproduksi oleh tubuh (Rizal & Rahayu, 2015). Jeruk (*Citrus sp.*) merupakan tanaman buah tahunan yang berasal dari Asia. Sejak ratusan tahun yang lalu, jeruk sudah tumbuh di Indonesia baik secara alami atau dibudidayakan. Sudah sekitar 70-80% dikembangkan di Indonesia dan setiap tahunnya mengalami perkembangan dalam pembudidayaannya baik mencakup luasan lahan, jumlah produksi bahkan permintaan pasar (Sekretariat Jenderal - Kementerian Pertanian, 2015).

2.1.1. Klasifikasi Tanaman

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Order : Sapindales
Family : Rutaceae
Subfamily : Aurantoideae
Genus : Citrus
Species : *Citrus reticulata*

(CCRC, 2014).



A

B

Gambar 2. 1 A. Tanaman jeruk (*Citrus reticulata*), B. Buah jeruk (*Citrus reticulata*) (Das et al., 2014).

2.1.2. Nama Daerah

Beberapa varietas jeruk keprok komersial hasil seleksi Balitjestro maupun dari Pemerintah Daerah yang sudah dilepas oleh Kementrian Pertanian dengan kualitas buah yang tidak kalah dengan jeruk impor antara lain Keprok Batu 55 berasal; dari Batu, Jawa Timur, keprok Garut dari Jawa Barat, keprok Pulung dari Jawa Timur, keprok Tawangmangu dari Jawa Tengah, dan keprok SOE dari NTT. Jenis keprok lainnya, seperti keprok Tejakula (Bali), keprok Madura, keprok Borneo Prima (Kaltim), dan keprok Trigas (Kalbar) tampaknya juga dapat berpotensi untuk dikembangkan di masa mendatang khususnya untuk dataran rendah (Nuryandani, dkk., 2012)

2.1.3. Morfologi Tanaman

Tumbuhan ini merupakan jenis pohon dengan tinggi 2-8 meter. Tangkai daun bersayap sangat sempit sampai boleh dikatakan tidak bersayap, panjang 0,5-1,5 cm. Helaian daun berbentuk bulat telur memanjang, elliptis atau berbentuk lanset dengan ujung tumpul, melekuk ke dalam sedikit, tepinya bergerigi beringgit sangat lemah dengan panjang 3,5-8 cm. Bunganya mempunyai diameter 1,5-2,5 cm, berkelamin dua daun mahkotanya putih. Buahnya berbentuk bola tertekan dengan panjang 5-8 cm, tebal kulitnya 0,2-0,3 cm dan daging buahnya berwarna oranye. Rantingnya tidak berduri dan tangkai daunnya selebar 1-1,5 mm (CCRC, 2014)

2.1.4. Penyebaran Tanaman

Buah jeruk bukan tanaman asli Indonesia. Negeri asal jeruk adalah Asia Tenggara, India, Cina, Australia dan Kaledonia Baru. Tanaman jeruk yang sekarang dibudidayakan di Indonesia dahulunya berasal dari daerah berhutan tropis yang intensitas curah hujannya cukup tinggi yaitu daerah Cina Selatan dan Vietnam. Di Indonesia tanaman jeruk sudah terdapat sejak ribuan tahun yang lalu. Tanaman ini semula tumbuh liar di hutan-hutan Sumatra, Kalimantan dan Jawa. Setelah daerah-daerah tersebut didiami oleh penduduk, jeruk mulai ditanam orang secara budidaya bersama tanaman-tanaman penghasil pangan yang lain. Daerah penyebaran jeruk di Indonesia yaitu Garut, Sukabumi, Purworejo, Karang Anyar, Sragen, Banyuwangi, Tulungagung, Jenepono, Pangkep, Bangli, Sambas, Pontianak, Sumedang, Bogor, Tasikmalaya, Cilacap, Banyumas, Solo, Madura, Malang, Palembang, Medan, Brastagi, Bali, Kalimantan Barat, Kalimantan Timur dan Sulawesi Selatan (Wahyuningsih, 2009).

2.1.5. Manfaat

Jeruk *Citrus reticulata* dipercaya memiliki beberapa khasiat yakni pada bagian buah digunakan sebagai memperbaiki nafsu makan, demam, mual, muntah, diare, sakit tenggorokan, pencahar, sakit gigi, sakit telinga (Das, *et al.*, 2014). Diketahui bahwa kulit jeruk *Citrus reticulata* mempunyai efek farmakologi antara lain sebagai anti-inflamasi, anti-mutagenik, anti-oksidan, anti-tumor, anti-arteriosklerosis, dan anti-bakteri. Kulit jeruk *Citrus reticulata* juga mengandung senyawa flavonoid yang cukup tinggi sehingga dapat digunakan untuk mencegah terjadinya obesitas dengan menurunkan berat badan dan mencegah tingginya kadar kolesterol didalam tubuh (Jasim, 2012).

2.1.6. Kandungan

Kulit jeruk *Citrus reticulata* mempunyai beebagai macam senyawa diantaranya adalah Tangeraxanthin, Tangeritin, Terpinen-4-ol, Terpeneolene, Tetradecanal, Threonine, Thymol, Thymyl- methyl-ether, Tryptophan, Tyrosine, Nobiletin, Cis-3-hexenol, Cis-carveol, Citric-acid, Citronellal, Citronellic-acid, Citronellyl-acetate, Cystine, Decanal, Decanoic- acid, Decanol (CCRC, 2014).

2.1.7 Aktivitas Antibakteri Kulit Buah *Citrus reticulata*

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sultana *et al.*, 2012 ekstrak kulit *Citrus reticulata* yang diperoleh dengan metode destilasi hidrolik dan untuk melihat aktivitas antibakteri digunakan metode difusi cakram. Dari proses penelitian tersebut didapatkan hasil bahwa dengan kulit buah *Citrus reticulata* memberikan zona hambat sebesar 16 mm dengan dosis 9 µL/ml.

Selain itu, pada penelitian yang dilakukan oleh (Kirbaslar *et al.*, 2009) ekstrak kulit *Citrus reticulata* yang diperoleh dengan metode ekstraksi pemerasan atau penekanan kemudian dilakukan pengujian antibakteri dengan menggunakan metode difusi cakram. Dari hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kulit buah *Citrus reticulata* memberikan zona hambar sebesar 14mm dengan dosis 20 µl.

2.2. Tinjauan Umum *Staphylococcus aureus*

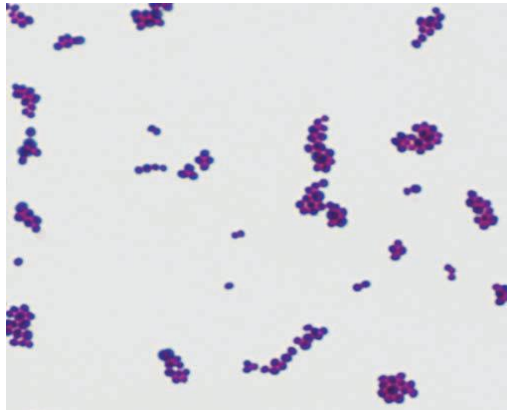
Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat biasanya tersusun dalam bentuk menggerombol yang tidak teratur seperti anggur. *Staphylococcus* bertambah dengan cepat pada beberapa tipe media dengan aktif melakukan metabolisme, melakukan fermentasi karbohidrat dan menghasilkan bermacam-macam pigmen dari warna putih hingga kuning gelap. *Staphylococcus* cepat menjadi resisten terhadap beberapa antimikroba (Brooks, *et al.*, 2013).

Staphylococcus adalah penyebab utama infeksi bernanah pada manusia yang terdapat di rongga hidung dan kulit sebagian besar populasi manusia. Jalur masuknya *Staphylococcus* ke tubuh melalui folikel rambut, tusukan jarum, dan juga dapat melalui saluran pernafasan (Triana, 2014).

2.2.1. Taksonomi

Kingdom : Bacteria
 Filum : Firmicutes
 Kelas : Bacilli
 Ordo : Bacillales
 Famili : Staphylococcaceae
 Genus : *Staphylococcus*
 Spesies : *Staphylococcus aureus*

(Brooks *et al.*, 2013).



Gambar 2. 2 Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* menunjukkan gram positif dengan pembesaran $\times 1000$ (Brooks, et al., 2013)

2.2.2. Morfologi

Staphylococcus aureus merupakan bakteri non motil, tidak berspora, bersifat gram positif, berbentuk bulat dengan diameter $1\mu\text{m}$ dan tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak beraturan seperti buah anggur. Namun terkadang ada yang bersifat gram negatif yaitu pada bakteri yang telah difagositosis atau pada biakan tua yang hampir mati (Amanati, 2014).

Staphylococcus aureus tumbuh dengan mudah pada media bakteriologis di bawah kondisi aerobik atau mikroaerofilik. Bakteri ini tumbuh paling banyak pada suhu 37°C tapi membentuk pigmen yang paling baik pada suhu kamar yaitu $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ (Brooks, et al., 2013)

2.2.3 Tinjauan Pewarnaan Gram

Karakteristik taksonomi penting pada bakteri adalah reaksi terhadap pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram menjadi penting karena reaksi tersebut berhubungan dengan sifat morfologi dalam membentuk hubungan filogenik (Mahrifah, 2013). Pewarnaan Gram digunakan untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna kristal violet-yodium tetap dipertahankan meskipun diberikan larutan pemucat. Sedangkan, bakteri Gram negatif berwarna merah disebabkan kompleks tersebut larut pada saat pemberian larutan pemucat sehingga mengambil warna merah safranin. perbedaan warna pada bakteri Gram positif dan Gram negatif yaitu karena perbedaan struktur dinding sel antara kedua jenis bakteri tersebut. Bakteri

Gram positif memiliki struktur dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan tebal. Sedangkan, bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan tipis dan mempunyai kandungan lipid yang tinggi (Fitri & Yasmin, 2011). Pengecatan Gram dikembangkan oleh Christian Gram dan merupakan salah satu pewarnaan yang paling sering digunakan (Dewi, 2013)

2.2.4. Patogenesis dan Patologi

Infeksi sering terjadi akibat dari *Staphylococcus aureus* melalui luka terbuka. Selain itu juga melalui saluran nafas dengan cara merusak lapisan mukosa dan menjadi predisposisi host terhadap *Staphylococcus aureus* pneumonia. Paparan awal *Staphylococcus aureus* ke jaringan inang diluar permukaan mukosa atau kulit yang dapat memicu upregulasi gen virulensi. Secara umum *Staphylococcus aureus* dapat bertahan dengan baik didalam maupun diluar sel inang. Tetapi, di lingkungan ekstraselular terjadi opsonisasi oleh komplemen dan antibodi yang secara langsung atau tidak langsung menyebabkan *Staphylococcus aureus* mati (Liu, 2010).

Kelompok *Staphylococcus aureus* yang terbentuk dalam folikel rambut dapat menyebabkan nekrosis jaringan (faktor dermonekrotik). Koagulase diproduksi yang menyebabkan fibrin menggumpal disekitar lesi dan dalam limfatik. Fokal supurasi (abses) merupakan infeksi khas *Staphylococcus*, organisme dapat menyebar melalui limfatik dan aliran darah ke bagian tubuh yang lain. Pada osteomielitis, fokus utama pertumbuhan *Staphylococcus aureus* biasanya berada dalam pembuluh darah terminal tulang panjang yang menyebabkan nekrosis tulang dan supurasi kronis. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan pneumonia, meningitis, empiema, endokarditis, atau sepsis. (Brooks, *et al.*, 2013)

2.3. Tinjauan Umum Infeksi

Penyakit infeksi masih menjadi masalah yang mendominasi dalam bidang kesehatan (Diyantika dkk, 2017). Hal ini dikarenakan penyakit infeksi dapat menular dengan cukup mudah kepada orang lain sehingga harus segera ditangani (Kulla, 2016). Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen dan bersifat sangat dinamis. Mikroba berkembang biak pada suatu *reservoir* yang cocok dan mampu mencari reservoir baru dengan cara berpindah atau menyebar, hal ini merupakan cara untuk bertahan hidup mikroba tersebut (Darnadi, 2008)

Penyebab utama terjadinya infeksi yaitu bakteri, virus, jamur, dan parasit, Salah satu infeksi yang cukup sering dan hampir menyerang semua manusia adalah infeksi oleh *Staphylococcus aureus* (Diyantika dkk, 2017).

2.4. Terapi

Indonesia merupakan negara kepulauan yang sangat luas, diperkirakan terdapat 100 sampai dengan 150 famili tumbuh-tumbuhan, dan dari jumlah tersebut sebagian besar mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai tanaman obat-obatan (Sudirga, 2012). Upaya pengobatan dengan menggunakan obat-obat tradisional merupakan salah satu bentuk peran serta masyarakat. Hal ini disebabkan karena pengobatan tradisional sudah sejak dahulu kala dimanfaatkan oleh masyarakat serta bahan-bahannya banyak terdapat di seluruh pelosok tanah air (Nursiyah, 2013). Agar pengobatan tradisional dapat dipertanggung jawabkan maka diperlukan penelitian ilmiah dalam bidang farmakologi, toksikologi, identifikasi dan isolasi zat kimia aktif yang terdapat dalam tumbuhan (Adfa, 2008).

Secara garis besar antibiotik dibagi menjadi dua jenis yaitu yang membunuh kuman (*bakterisid*) dan yang hanya menghambat pertumbuhan kuman (*bakteriostatik*). Antibiotik yang termasuk golongan bakterisid antara lain penisilin, sefalosporin, aminoglikosida (dosis besar), kotrimoksazol, rifampisin, isoniazid dan lain-lain. Sedangkan antibiotik golongan bakteriostatik dimana penggunaannya tergantung status imunologi pasien antara lain sulfonamida, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, trimetropim, linkomisin, klindamisin, asam paraaminosalisilat, dan lain-lain (Utami, 2012). Saat ini, *Staphylococcus aureus* menjadi masalah yang serius karena meningkatnya resistensi bakteri terhadap berbagai jenis antibiotik MDR (*Multi Drug Resistance*). Angka kejadian infeksi *Staphylococcus aureus* meningkat dengan munculnya strain yang resisten terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Negara, 2014).

Pada awal ditemukannya antibiotik penisilin pada tahun 1959, infeksi *Staphylococcus aureus* dapat diatasi dengan pemberian antibiotik penisilin, namun dalam waktu dua tahun muncul kasus pertama infeksi *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap methicillin, yang lebih dikenal dengan galur *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Resistensi galur MRSA terhadap methicillin

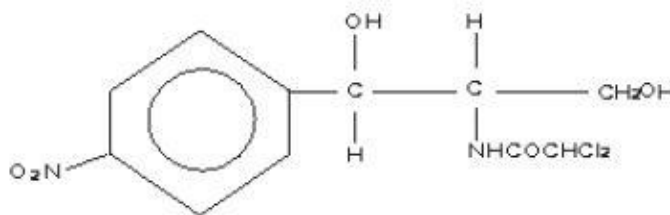
disebabkan karena bakteri tersebut mendapatkan gen *mecA* yang mengkode protein *penicillin-binding protein 2a* (PBP2a) (Erikawati dkk, 2016).

Vankomisin merupakan obat pilihan untuk mengobati infeksi MRSA yang digunakan lebih dari empat dekade, isolasi pertama *Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus* (VISA) baru diperkenalkan pada tahun 1996. Tak lama kemudian isolat VISA heteroresisten dan *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* (VRSA) muncul. antibiotik baru yang dapat menjadi pilihan dalam pengobatan MRSA ialah linezolid dan daptomisin. Tetapi, obat-obat tersebut memiliki efek samping yang cukup serius (Hardana & Warganegara, 2015).

2.5. Tinjauan Umum Antibiotik

Antibiotika, yang pertama kali ditemukan oleh Paul Ehrlich pada 1910, sampai saat ini masih menjadi obat andalan dalam penanganan kasus-kasus penyakit infeksi. Pemakaiannya selama 5 dekade terakhir mengalami peningkatan yang luar biasa, hal ini tidak hanya terjadi di Indonesia tetapi juga menjadi masalah di negara maju seperti Amerika Serikat (Utami, 2012). Antibiotik memiliki dua efek utama, secara terapeutik obat ini menyerang organisme infeksius dan juga mengeliminasi bakteri lain yang bukan penyebab penyakit. Efek lainnya merupakan penyebab perubahan keseimbangan ekosistem antara strain yang peka dan yang resisten, konsekuensinya dapat terjadi gangguan ekologi mikrobial alami. Penggunaan antibiotik dalam jumlah yang banyak dan penggunaannya salah diduga sebagai penyebab utama tingginya jumlah patogen dan bakteri komensal resisten di seluruh dunia. Hal ini menyebabkan meningkatnya kebutuhan akan antibiotik-antibiotik baru. Penggunaan anti biotik yang tepat adalah penggunaan antibiotik yang efektif dari segi biaya dengan peningkatan efek terapeutik klinis, meminimalkan toksisitas obat dan meminimalkan terjadinya resistensi (Amin, 2014).

2.5.1. Mekanisme Kloramfenikol



Gambar 2. 3 Struktur bangun kloramfenikol (Susanti dkk, 2009)

Kloramfenikol adalah salah satu jenis antibiotika turunan amfenikol yang secara alami diproduksi oleh *Streptomyces venezuelae* (Susanti dkk, 2009). Kloramfenikol merupakan antibiotika spektrum luas dengan aktifitas mengobati bermacam-macam infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen. Pada dasarnya kloramfenikol bersifat sebagai bakteriostatik dan pada konsentrasi tinggi kadang-kadang bersifat sebagai bakterisid terhadap bakteri-bakteri tertentu (Oktavia, 2016).

Mekanisme kerja kloramfenikol sebagai antibakteri bersifat stereospesifik. Kloramfenikol bekerja pada spektrum luas, efektif terhadap gram positif maupun gram negatif. Mekanisme kerja kloramfenikol melalui penghambatan terhadap biosintesis protein pada siklus pemanjangan rantai asam amino, yaitu dengan menghambat pembentukan ikatan peptida. Antibiotik ini mampu mengikat subunit ribosom 50S sel mikroba target secara terpulihkan, akibatnya terjadi hambatan pembentukan ikatan peptida dan biosintesis protein (Susanti dkk, 2009).

2.6. Metode Ekstraksi

2.6.1. Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu zat dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ketika kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman telah tercapai proses ekstraksi tersebut dapat dihentikan. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Ekstrak awal sulit dipisahkan ketika menggunakan teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama (Mukhriani, 2014). mengatakan bahwa metode ekstraksi dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu ekstraksi sederhana dan ekstraksi khusus.

Ekstraksi sederhana meliputi maserasi, perkolasi, reperkolasi, evakolasi, dan dialokasi. Ekstraksi khusus meliputi sokletasi, arus balik dan ultrasonik (Fauzana, 2010).

2.6.2. Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada simplisia. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Dirjen POM, 1986)

2.6.3. Cara-cara Ekstraksi

Teknik ekstraksi yang ideal yaitu, teknik ekstraksi yang mampu mengekstraksi bahan aktif yang diinginkan sebanyak mungkin, cepat, mudah dilakukan, murah, ramah lingkungan, dan hasil yang diperoleh selalu konsisten jika dilakukan berulang-ulang (Kumoro, 2015). Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu (Mukhriani, 2014). Beberapa metode ekstraksi yang dapat digunakan yaitu :

a. Maserasi

Teknik ini dilakukan dengan merendam bagian tanaman secara utuh atau yang telah digiling kasar dengan pelarut dalam bejana tertutup pada suhu kamar selama 3 hari dengan pengadukan berkali-kali sampai semua bagian tanaman yang dapat larut melarut dalam cairan pelarut. Pelarut yang digunakan adalah alkohol atau terkadang menggunakan air. Campuran ini kemudian disaring dan ampas yang diperoleh diperas untuk memperoleh bagian cairannya saja. Cairan yang diperoleh kemudian dijernihkan dengan penyaringan atau dekantasi setelah dibiarkan selama waktu tertentu (Kumuro, 2015).

b. Infusi

Teknik ini dibuat dengan maserasi bagian tanaman dengan air dingin atau air mendidih dalam jangka waktu yang pendek. Pemilihan suhu infuse tergantung pada ketahanan senyawa bahan aktif yang diekstraksi terhadap paparan panas. Larutan encer yang mengandung senyawa bahan aktif yang diperoleh selanjutnya segera digunakan sebagai obat cair. Hasil infuse tidak dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama karena tidak menggunakan

bahan pengawet. Namun pada beberapa kasus, hasil infusi (larutan infuse) dipekatkan lagi dengan pendidihan yang bertujuan untuk mengurangi kadar air dan ditambahkan sedikit alkohol sebagai pengawet (Kumoro, 2015).

c. Pemasakan

Teknik ini merupakan proses maserasi yang dilakukan dengan pemanasan secara perlahan-lahan selama proses ekstraksi. Proses ini dilakukan jika bahan aktif dalam bagian tanaman tidak mengalami kerusakan oleh pemanasan hingga mencapai diatas suhu kamar. Dengan penggunaan sedikit panas, maka efesiensi pelarut dalam mengekstraksi bahan aktif dapat meningkat (Kumoro, 2015).

d. Dekoksi

Pada teknik ini bagian tanaman yang berupa batang, kulit kayu, cabang, ranting, rimpang, atau akar direbus dalam air mendidih dengan volume dan selama waktu tertentu. Kemudian didinginkan dan ditekan atau disaring untuk memisahkan cairan ekstrak dari ampasnya. Proses ini sesuai untu mengekstrak bahan bioaktif yang dapat larut dalam air dan tahan terhadap panas. Rasio antara massa bagian tanaman dengan volume air biasanya 1:4 atau 1:16. Selama proses perebusan berlangsung air harus menguap secara terus-menerus, sehingga volume cairan ekstrak yang diperoleh biasanya hanya seperempat dari volume semula. Kemudian ekstrak yang telah pekat selanjutnya disaring dan segera digunakan atau diproses lebih lanjut (Kumoro, 2015).

e. Perkolasi

Teknik ini merupakan yang paling sering digunakan untuk mengekstraksi bahan aktif dari bagian tanaman. Sebuah perkolator biasanya berupa silinder yang sempit dan panjang dengan kedua ujungnya kerucut dan terbuka. Bagian tanaman yang akan diekstrak dibasahi dengan sejumlah pelarut yang sesuai dan dibiarkan selama kurang lebih 4 jam dalam tangki tertutup. Selanjutnya, bagian tanaman ini dimasukkan kedalam perkolator dan bagian atasnya ditutup rapat. Sejumlah pelarut biasanya ditambahkan hingga membentuk lapisan tipis diatas bagian tanaman yang akan dieksrak. Bagian tanaman ini dibiarkan selama 24 jam setelah itu, cairan hasil perkolasi dibiarkan keluar dengan membuka tutup bagian bawah perkolator.

Sejumlah pelarut ditambahkan lagi (untuk membilas) sesuai dengan kebutuhan sehingga cairan ekstrak yang diperoleh menjadi kurang lebih tiga per empat dari volume yang diinginkan dalam produk akhir. Ampas ditekan, dan cairan yang diperoleh ditambahkan kedalam cairan ekstrak. Selanjutnya, sejumlah pelarut ditambahkan lagi kedalam cairan ekstrak untuk memperoleh ekstrak dengan volume yang diinginkan. Campuran ekstrak yang diperoleh dijernihkan dengan penyaringan atau sedimentasi (Kumoro, 2015).

f. *Soxhlet*

Pada teknik ini dilakukan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu reflux. Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi yang kontinyu, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugiannya adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih (Mukhriani, 2014).

2.7. Tinjauan Pelarut

Faktor terpenting dalam ekstraksi yaitu pemilihan pelarut yang sesuai karena, jenis dan mutu dari pelarut yang digunakan sangat menentukan keberhasilan proses ekstraksi tersebut. Proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut didasarkan pada sifat kepolarannya. Senyawa polar akan larut pada pelarut polar (air, etanol, metanol, dan butanol), senyawa non polar akan larut pada pelarut non-polar (n-heksan, eter, kloroform) (Kasminah, 2016).

Pelarut yang biasa digunakan dalam proses ekstraksi antara lain :

- Etanol Sering digunakan sebagai pelarut dalam laboratorium karena mempunyai kelarutan yang relatif tinggi dan bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan komponen lainnya. Etanol memiliki titik didih yang rendah sehingga memudahkan pemisahan minyak dari pelarutnya dalam proses distilasi.

- Etil asetat merupakan jenis pelarut yang bersifat semi polar. Pelarut ini memiliki titik didih yang relatif rendah yaitu 77°C sehingga memudahkan pemisahan minyak dari pelarutnya dalam proses destilasi.
- n-Heksana Merupakan pelarut yang paling ringan dalam mengangkat minyak yang terkandung dalam biji-bijian dan mudah menguap sehingga memudahkan untuk refluks. Pelarut ini memiliki titik didih antara 65–70°C (Susanti dkk, 2012).

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut diantaranya adalah selektivitas, toksisitas, kepolaran, kemudahan untuk diuapkan, dan harga pelarut (Putri W.S dkk, 2013).

2.7.1. Etil-Asetat

Etil asetat mempunyai rumus ($C_4H_8O_2$) yang dapat digunakan sebagai pelarut, walaupun terkadang juga digunakan sebagai flavoring agent. Etil asetat berbentuk cairan, tidak berwarna, mudah menguap, dan berbau sedap, serta mudah terbakar. Etil asetat dapat bereaksi keras dengan oksidasi kuat, asam kuat, dan nitrat yang dapat menyebabkan ledakan atau kebakaran. Etil asetat dapat dihasilkan dari destilasi dari campuran etanol dan asam asetat dengan adanya asam sulfat pekat. Hal ini juga disusun dari etilen menggunakan katalis aluminium alkoksida (HPE, 2015).

Etil asetat merupakan pelarut dengan toksisitas rendah yang bersifat semi polar sehingga diharapkan dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar (Putri W.S dkk, 2013).

2.8. Uji Kepekaan Antimikroba Secara In-Vitro

Uji kepekaan terhadap antimikroba adalah penentuan terhadap bakteri penyebab penyakit yang kemungkinan menunjukkan resistensi terhadap suatu antimikroba. Uji kepekaan antimikroba dimulai ketika WHO memprakarsai pertemuan di Jenewa pada tahun 1977. Sejak awal abad 20 antibiotik sebagai agen kemoterapi telah sukses dalam penyembuhan penyakit infeksi oleh bakteri, namun penyakit infeksi masih menjadi penyebab utama kematian diseluruh dunia. Bakteri penyebab infeksi telah mengembangkan perlindungan terhadap senyawa biokimia lingkungan, dan untuk resistensi terhadap antibiotik. Hal ini memicu program pengawasan untuk memantau resistensi antimikroba menggunakan metode yang

tepat. Terdapat tiga cara yang dapat digunakan dalam uji kepekaan terhadap antimikroba yaitu metode difusi cakram, metode dilusi, dan metode bioautografi (Soleha, 2015).

2.8.1. Metode Difusi Cakram

Metode difusi cakram diperkenalkan oleh William Kirby dan Alfred bauer pada tahun 1966 (Farida., 2015). Metode difusi merupakan metode kuantitatif yang digunakan untuk mendeteksi zat penghambat dalam susu di Amerika Serikat dan sering digunakan dalam pengujian antimikroba. Pada perosedur metode difusi cakram kertas saring (diameter sekitar 6 mm) diletakkan pada permukaan agar (media padat) yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Cawan petri di inkubasi setelah itu, zona hambatnya diukur (Choma & Grzelak, 2010). *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) merupakan konsentrasi terendah bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil yang dilihat dari pertumbuhan koloni pada agar atau kekeruhan pada pembiakan cair (Soleha, 2015). MIC ditentukan secara visual, sebagai konsentrasi senyawa uji terendah yang menyebabkan zona hambat pertumbuhan dapat dikenali. Namun, metode difusi kurang sesuai untuk menentukan nilai MIC karena tidak dapat mengukur jumlah senyawa uji terdifusi kedalam media agar (Choma & Grzelak, 2010). Semakin luas zona hambat, maka semakin kecil konsentrasi daya hambat minimum MIC (Soleha, 2015).

2.8.2. Metode Dilusi

Metode dilusi merupakan metode yang digunakan untuk memperkiraan konsentrasi senyawa uji dalam media agar atau dalam suspensi kaldu. Sampel yang digunakan dapat berupa ekstrak kompleks, zat murni, yang bersifat polar maupun non polar. Dalam metode ini berbagai konsentrasi dari senyawa yang diuji dicampur dengan agar nutrien. Agar nutrien diinokulasi dan kemudian diinkubasi. Pada konsentrasi terendah dari zat antimikroba tidak terdeteksi adanya pertumbuhan mikroorganisme. Metode ini biasanya digunakan untuk menentukan nilai MIC dan nilai tersebut dapat dibandingkan dengan konsentrasi obat yang didapat diserum dan cairan tubuh lainnya (Choma & Grzelak, 2010; Soleha, 2015)

Terdapat dua teknik pengerjaan dalam metode dilusi, yaitu teknik dilusi agar dan dilusi pembenihan cair. Tujuan dari kedua teknik tersebut yaitu untuk menentukan aktivitas antimikroba secara kuantitatif

a. Dilusi agar

Pada teknik dilusi agar antibiotik yang sesuai dengan pengenceran ditambahkan ke dalam agar. Dibutuhkan pembenihan agar yang sesuai dengan jumlah pengenceran dan ditambahkan satu pembenihan agar tanpa penambahan antibiotik. Penentuan *Minimum bactericidal concentration* (MBC) dilakukan dengan menanamkan bakteri pada pembenihan cair kedalam agar kemudian diinkubasi selama satu malam pada suhu 37°C. MBC adalah ketika tidak terjadi pertumbuhan lagi pada agar. Keuntungan dari teknik ini memungkinkan untuk penentuan kualitatif dan kuantitatif dilakukan secara bersama-sama, kerugian dari teknik ini yaitu tidak efisien karena pengerjaannya yang rumit, diperlukan banyak alat yang digunakan, dan memerlukan ketelitian dalam proses pengerjaannya (Soleha, 2015).

b. Dilusi pembenihan cair

Pada teknik dilusi pembenihan cair mempunyai dua bentuk yaitu mikrodilusi dan makrodilusi. Pada prinsipnya pengerjaan sama hanya berbeda pada volume. Untuk mikrodilusi menggunakan volume 0,05 ml-0,1 ml, sedangkan makrodilusi menggunakan volume yang lebih besar yaitu lebih dari 1 ml (Soleha, 2015).

2.8.3. Metode Bioautografi

Metode bioautografi merupakan metode skrining mikrobiologi yang umum digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antimikroba. Skrining merupakan prosedur pertama yang dilakukan pada sampel yang akan dianalisis, untuk mengetahui ada atau tidaknya analit yang didapat. Metode ini memiliki kelebihan yaitu, sederhana dan tidak memerlukan peralatan yang canggih (Andidha, 2015).

Metode bioautografi kontak mempunyai prosedur yang sama dengan difusi agar, perbedaannya terletak pada senyawa yang teruji berdifusi ke media agar yang diokulasi dari kromatografi lapis tipis (KLT). Dalam metode bioautografi plat KLT atau kromatografi kertas diletakkan pada permukaan agar, diinokulasi selama beberapa menit atau jam untuk memungkinkan terjadinya proses difusi.

Selanjutnya, plat KLT dilepas dan lapisan agar diinkubasi. Daerah hambatan ditunjukkan dengan adanya spot antimikroba yang menempel pada permukaan media agar. Pada metode bioautografi agar-overlay plat KLT dicelupkan pada media agar, setelah agar dipadatkan tambahkan mikroorganisme yang akan diuji lalu diinkubasi. Diantara semua metode bioautografi, metode bioautografi langsung yang paling banyak digunakan. Prinsip dari metode ini adalah plat KLT dicelupkan dalam suspensi mikroorganisme lalu diinkubasi dalam suasana yang lembab (Choma & Grzelak, 2010).

2.9. Tinjauan DMSO

Metode pengenceran konvensional dilakukan untuk mengukur *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan dibutuhkan berbagai pengenceran senyawa dalam pelarut yang sesuai. Pelarut air sering tidak mampu melarutkan ekstrak kering dikarenakan memiliki polaritas yang berbeda. Sehingga, alternatif untuk melarutkan ekstrak adalah dengan pelarut metanol, etanol, atau DMSO (Wadhvani *et al.*, 2008).

DMSO atau *Sulfoxide Dimetil* merupakan pelarut polar aprotik dengan rumus $(CH_3)_2SO$. Pelarut ini tidak berwarna dan dapat melarutkan baik senyawa polar maupun non-polar serta dapat larut dalam berbagai pelarut organik maupun air (BPOM, 2011). DMSO digunakan sebagai pelarut untuk senyawa farmakologis, terapeutik, eksipien untuk formulasi terapeutik, dan sebagai kontrol untuk menguji produk alami (Costa *et al.*, 2017).